

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 octobre 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/086157 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68, A61K 38/17, 48/00, 31/00, G01N 33/00

(74) Mandataire : CABINET LAURENT ET CHARRAS;
29, rue Louis Chirpaz, B.P. 32, F-69134 Ecully Cedex (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00118

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
11 janvier 2002 (11.01.2002)

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt : français

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(26) Langue de publication : français

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale : 16 octobre 2003

(30) Données relatives à la priorité : 60/284,508

19 avril 2001 (19.04.2001) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : URO-GENE SOCIETE ANONYME [FR/FR]; 4, rue Pierre Fontaine, F-91000 Evry (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LATIL, Alain [FR/FR]; 2, parc de Diane, F-78350 Jouy en Josas (FR). CUSSENOT, Olivier [FR/FR]; 60, rue du Capitaine Ferber, F-75020 Paris (FR). ALGARTE-GENIN, Michèle [FR/FR]; 85, boulevard Pasteur, appartement F210, F-75015 Paris (FR).

(54) Title: USE OF SEMAPHORIN 3A FOR DIAGNOSING AND TREATING CANCER, ESPECIALLY PROSTATE CANCER

(54) Titre : UTILISATION DE LA SEMAPHORINE-3A POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DU CANCER, NOTAMMENT DE LA PROSTATE

(57) Abstract: The invention relates to a method for *in vitro* evaluation of the aggressiveness of tumoral cells by measuring the level of expression of all or part of a gene coding for semaphorin 3A in healthy epithelial cells and in epithelial tumoral cells. The invention also relates to a method for inhibiting the invasive power of said epithelial tumoral cells, consisting in increasing the levels of semaphorin 3A levels present in and/or in the vicinity of said epithelial tumoral cells.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'évaluation *in vitro* de l'agressivité de cellules tumorales par mesure du niveau d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A dans des cellules épithéliales saines et dans des cellules tumorales épithéliales. Elle concerne également un procédé d'inhibition du pouvoir invasif desdites cellules tumorales épithéliales qui consiste à augmenter le taux de sémaphorine-3A présent au sein, et/ou à proximité, desdites cellules tumorales épithéliales.

WO 02/086157 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/EP 02/00118A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 A61K38/17 A61K48/00 A61K31/00 G01N33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, CANCERLIT, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 29729 A (TAKASHIMA SEIJI ;KLAGSBRUN MICHAEL (US); MIAO HUA QUAN (US); SOKER) 17 June 1999 (1999-06-17) cited in the application page 15, line 11 -page 16, line 23 ----	10-18

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 June 2003

Date of mailing of the international search report

27/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Renggli-Zulliger, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 02/00118

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BRAMBILLA E ET AL: "Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. UNITED STATES MAR 2000, vol. 156, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 939-950, XP002243901 ISSN: 0002-9440 abstract page 941, right-hand column, last paragraph -page 945; table 2 page 949</p> <p>---</p>	1-18
A	<p>LATIL A ET AL: "VEGF OVEREXPRESSION IN CLINICALLY LOCALIZED PROSTATE TUMORS AND NEUROPILIN-1 OVEREXPRESSION IN METASTATIC FORMS" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 89, no. 2, 20 March 2000 (2000-03-20), pages 167-171, XP001025512 ISSN: 0020-7136 abstract page 171, left-hand column, paragraph 2; table 1</p> <p>---</p>	1-18
A	<p>THOMASSET N. ET AL: "SEMA3A/VEGF165 BALANCE MEDIATES MIGRATION AND APOPTOSIS OF PRIMITIVE NEUROECTODERMAL TUMOR CELLS THROUGH DIFFERENTIAL" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, BETHESDA, MD, US, vol. 11, no. SUPPL, December 2000 (2000-12), page 85A XP001057520 ISSN: 1059-1524 abstract</p> <p>---</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 02/00118

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although Claims 10-15 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Search Report No	Application No
PCT/ISA/210	02/00118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9929729	A 17-06-1999	AU 1633999 A	28-06-1999
		AU 1810499 A	28-06-1999
		AU 1810899 A	28-06-1999
		AU 1906099 A	28-06-1999
		CA 2313348 A1	17-06-1999
		CA 2313390 A1	17-06-1999
		CA 2313607 A1	17-06-1999
		EP 1037981 A1	27-09-2000
		EP 1037925 A2	27-09-2000
		EP 1037994 A1	27-09-2000
		JP 2002505078 T	19-02-2002
		JP 2001526032 T	18-12-2001
		WO 9929861 A1	17-06-1999
		WO 9929729 A2	17-06-1999
		WO 9930157 A2	17-06-1999
		WO 9929858 A1	17-06-1999
		US 2002132774 A1	19-09-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No
PCT/FR 02/00118

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
C1B 7 C12Q1/68 A61K38/17 A61K48/00 A61K31/00 G01N33/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C1B 7 C12Q A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, CANCERLIT, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 29729 A (TAKASHIMA SEIJI ; KLAGSBRUN MICHAEL (US); MIAO HUA QUAN (US); SOKER) 17 juin 1999 (1999-06-17) cité dans la demande page 15, ligne 11 -page 16, ligne 23 --- -/-	10-18

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 12 juin 2003	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27/06/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Renggli-Zulliger, N

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: Internationale No
PCT/FR 02/00118

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BRAMBILLA E ET AL: "Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. UNITED STATES MAR 2000, vol. 156, no. 3, mars 2000 (2000-03), pages 939-950, XP002243901 ISSN: 0002-9440 abrégé page 941, colonne de droite, dernier alinéa -page 945; tableau 2 page 949</p> <p>-----</p>	1-18
A	<p>LATIL A ET AL: "VEGF OVEREXPRESSION IN CLINICALLY LOCALIZED PROSTATE TUMORS AND NEUROPILIN-1 OVEREXPRESSION IN METASTATIC FORMS" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 89, no. 2, 20 mars 2000 (2000-03-20), pages 167-171, XP001025512 ISSN: 0020-7136 abrégé page 171, colonne de gauche, alinéa 2; tableau 1</p> <p>-----</p>	1-18
A	<p>THOMASSET N. ET AL: "SEMA3A/VEGF165 BALANCE MEDIATES MIGRATION AND APOPTOSIS OF PRIMITIVE NEUROECTODERMAL TUMOR CELLS THROUGH DIFFERENTIAL" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, BETHESDA, MD, US, vol. 11, no. SUPPL, décembre 2000 (2000-12), page 85A XP001057520 ISSN: 1059-1524 abrégé</p> <p>-----</p>	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D internationale n°
PCT/FR 02/00118

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Bien que les revendications 10-15 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétendent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux ~~numéros~~ familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 02/00118

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9929729	A 17-06-1999	AU 1633999 A	28-06-1999
		AU 1810499 A	28-06-1999
		AU 1810899 A	28-06-1999
		AU 1906099 A	28-06-1999
		CA 2313348 A1	17-06-1999
		CA 2313390 A1	17-06-1999
		CA 2313607 A1	17-06-1999
		EP 1037981 A1	27-09-2000
		EP 1037925 A2	27-09-2000
		EP 1037994 A1	27-09-2000
		JP 2002505078 T	19-02-2002
		JP 2001526032 T	18-12-2001
		WO 9929861 A1	17-06-1999
		WO 9929729 A2	17-06-1999
		WO 9930157 A2	17-06-1999
		WO 9929858 A1	17-06-1999
		US 2002132774 A1	19-09-2002

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 octobre 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/086157 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68 (74) Mandataire : SAUVAGE, Renée; Cabinet Sauvage, 6
boulevard Soult, F-75012 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00118

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
11 janvier 2002 (11.01.2002)

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(25) Langue de dépôt : français
(26) Langue de publication : français

Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(30) Données relatives à la priorité :
60/284,508 19 avril 2001 (19.04.2001) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : URO-GENE SOCIETE ANONYME [FR/FR]; 4, rue Pierre Fontaine, F-91000 Evry (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LATIL, Alain [FR/FR]; 2, parc de Diane, F-78350 Jouy en Josas (FR). CUSSENOT, Olivier [FR/FR]; 60, rue du Capitaine Ferber, F-75020 Paris (FR). ALGARTE-GENIN, Michèle [FR/FR]; 85, boulevard Pasteur, appartement F210, F-75015 Paris (FR).

(54) Title: USE OF SEMAPHORIN 3A FOR DIAGNOSING AND TREATING CANCER, ESPECIALLY PROSTATE CANCER

(54) Titre : UTILISATION DE LA SEMAPHORINE-3A POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DU CANCER, NOTAMMENT DE LA PROSTATE

(57) Abstract: The invention relates to a method for *in vitro* evaluation of the aggressiveness of tumoral cells by measuring the level of expression of all or part of a gene coding for semaphorin 3A in healthy epithelial cells and in epithelial tumoral cells. The invention also relates to a method for inhibiting the invasive power of said epithelial tumoral cells, consisting in increasing the levels of semaphorin 3A levels present in and/or in the vicinity of said epithelial tumoral cells.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'évaluation *in vitro* de l'agressivité de cellules tumorales par mesure du niveau d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A dans des cellules épithéliales saines et dans des cellules tumorales épithéliales. Elle concerne également un procédé d'inhibition du pouvoir invasif desdites cellules tumorales épithéliales qui consiste à augmenter le taux de sémaphorine-3A présent au sein, et/ou à proximité, desdites cellules tumorales épithéliales.

WO 02/086157 A2

Utilisation de la sémaphorine-3A pour le diagnostic et le traitement du cancer, notamment de la prostate.

La présente invention concerne, d'une manière générale, 5 le diagnostic, l'évaluation et le traitement de cancers, et plus particulièrement du cancer de la prostate. De manière spécifique, la présente invention a pour objet un procédé d'évaluation du pouvoir invasif des cellules tumorales et un procédé de traitement desdites cellules tumorales. La 10 présente invention décrit également des kits et compositions pour la mise en oeuvre desdits procédés.

Actuellement, le cancer de la prostate est, après le cancer broncho-pulmonaire, le cancer le plus répandu chez l'homme, et plus particulièrement chez l'homme de plus de 50 15 ans (1, 2, 3) [les chiffres en gras, entre parenthèses, renvoient à la liste de références bibliographiques annexée].

Du fait de l'importance et de l'accroissement du nombre d'homme atteints par ce cancer, l'étude de son développement et la recherche de traitements efficaces et peu coûteux sont 20 devenues, ces derniers temps, des priorités du monde médical.

De manière générale, trois processus majeurs participent au développement des tumeurs épithéliales malignes, à savoir la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse.

25 Dans une première étape, il se produit l'augmentation de la masse tumorale due à la prolifération des cellules cancéreuses et à la diminution des processus apoptotiques physiologiques.

De façon concomitante, l'angiogenèse est le processus 30 qui conduit à la formation de vaisseaux sanguins venant vasculariser la tumeur et permettre son développement. L'angiogenèse consiste en la prolifération et la migration de cellules endothéliales saines des vaisseaux sanguins et lymphatiques situés à proximité de la tumeur, sous l'effet de 35 facteurs de croissance sécrétés par les cellules cancéreuses. Ces facteurs de croissance sont par exemple les VEGF ; ils

agissent par l'intermédiaire de récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales tels que VEGFR-1 (flt-1) ou VEGFR-2 (flk-1).

Dans une seconde étape, l'invasion des tissus sains 5 environnents conduit à l'extension de la tumeur par deux mécanismes concomitants : (i) la dégradation enzymatique de la lame basale et (ii) la migration des cellules vers les tissus environnents. Au final, l'invasion peut conduire à la formation de métastases distantes, lorsque les cellules 10 tumorales atteignent la circulation sanguine.

Par "prolifération", il faut comprendre la multiplication rapide des cellules, ladite multiplication ayant lieu par division des cellules au moment de la mitose.

Par "migration", il faut comprendre la capacité qu'ont 15 les cellules tumorales malignes à se déplacer.

L'une des approches pour trouver des gènes impliqués dans ces différents processus a consisté à déterminer et comparer les niveaux d'expression de nombreux gènes chez des cellules saines ainsi que des cellules tumorales de manière à 20 mettre en évidence des différences d'expression au niveau desdites cellules saines et cellules tumorales.

Les gènes ainsi identifiés peuvent servir à développer des procédés diagnostiques ou thérapeutiques plus ciblés en fonction du stade de développement de la pathologie.

25 Par cette approche, les inventeurs ont identifié, d'une part, la sémaphorine-3A comme un potentiel gène suppresseur de tumeur et, d'autre part, le récepteur de la sémaphorine-3A, la neuropiline-1, comme une cible thérapeutique pour traiter les tumeurs épithéliales à un 30 stade avancé.

La neuropiline est un récepteur membranaire initialement décrit dans les cellules du système nerveux puis identifié dans les cellules endothéliales et épithéliales. Deux formes de neuropiline ont été décrites, la neuropiline-1 35 et la neuropiline-2, possédant des propriétés différentes. Ces deux formes ont pour ligands les sémaphorines-3E et -3F

ainsi que le VEGF₁₆₅ tandis que seule la neuropiline-1 est capable de fixer la sémaphorine-3A avec une forte affinité (4). La famille des sémaphorines comprend une vingtaine de membres répartis dans 8 classes. Certains sont des protéines solubles sécrétées alors que d'autres sont des protéines transmembranaires. La classe 3 est la mieux caractérisée et comprend six membres (Sema3A-F).

Dans les neurones, la neuropiline-1 est associée à des protéines membranaires de la famille des plexines (5, 6). Ce récepteur hétérodimérique a pour ligand la sémaphorine-3A, qui entraîne la répulsion du cône de croissance en développement. De nombreuses expériences ont montré un développement des axones dans le sens opposé de gradients de sémaphorine-3A participant ainsi au développement architectural du système nerveux (7, 8).

Dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, la neuropiline-1 est associée aux récepteurs de la famille VEGFR. Le récepteur hétérodimérique formé par la neuropiline-1 et le VEGFR2 (flk-1) a pour ligand le VEGF₁₆₅ et sa fixation audit ligand entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaires, deux mécanismes participant au processus de l'angiogénèse, notamment au cours du développement tumoral (9, 10, 11).

Enfin, la neuropiline-1 a également été identifiée dans des cellules tumorales d'origine épithéliale. Certains travaux ont montré que le VEGF₁₆₅ stimulait la migration de cellules épithéliales tumorales exprimant la neuropiline-1. Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, il a été proposé que, dans ces cellules, la neuropiline-1 agisse comme récepteur unique du VEGF₁₆₅ (12).

Sur la base de ces données, plusieurs procédés ont été proposés visant à réduire le développement des tumeurs par une inhibition de l'action du VEGF₁₆₅ sur la neuropiline-1.

Deux méthodes ont, par exemple, été proposées pour empêcher la fixation du VEGF₁₆₅ sur la neuropiline-1.

Tout d'abord, l'utilisation de formes solubles de la neuropiline-1 capables de fixer le VEGF₁₆₅ dans le milieu extracellulaire. Deux formes solubles de la neuropiline-1 ont été décrites. Il s'agit des formes nommées S11 et S12 qui 5 correspondent à des variants d'épissage de la neuropiline-1 (13). L'isoforme S₁₂NRP peut se fixer sur le VEGF₁₆₅. La surexpression de S₁₂NRP dans des cellules AT2 (carcinome prostatique de rat) injectées chez l'animal diminuent le développement de la tumeur (14).

10 Par ailleurs, l'utilisation de molécules entrant en compétition avec le VEGF₁₆₅ a été proposée, et en particulier l'utilisation de la sémaphorine-3A.

Plusieurs études ont montré que, dans les cellules endothéliales, la sémaphorine-3A était capable d'entrer en 15 compétition avec le VEGF₁₆₅ pour se fixer sur la neuropiline-1. Cela entraîne une réduction de l'effet du VEGF₁₆₅ sur la prolifération des cellules (15, 16).

Il a également été récemment décrit que le VEGF₁₆₅ et la sémaphorine-3A, en entrant mutuellement en compétition pour 20 se fixer à la neuropiline-1, agissent sur la migration et la rétraction cellulaire (12).

WO 99/29729 décrit l'utilisation d'un antagoniste de la neuropiline-1, et plus particulièrement d'un membre de la famille sémaphorine/collapsine, qui a une activité 25 antagoniste au VEGF₁₆₅ pour inhiber les métastases chez un patient ayant des cellules tumorales malignes.

Plus particulièrement, WO 99/29729 met en évidence que des membres de la famille sémaphorine/collapsine ne sont pas seulement des inhibiteurs de l'adressage neuronal, mais 30 qu'ils sont également des inhibiteurs de la mobilité des cellules endothéliales et tumorales qui expriment la neuropiline-1. Le mécanisme proposé est que la sémaphorine-3A entre en compétition avec le VEGF₁₆₅ au niveau de la neuropiline-1 et bloque ainsi la voie favorisant 35 l'angiogénèse. C'est cette action anti-angiogénique qui

serait responsable de l'inhibition du développement de la tumeur.

Un tel mode d'action de la sémaphorine-3A sera appelé par la suite "voie VEGF".

5 En d'autres termes, la sémaphorine-3A n'avait été décrite, jusqu'à ce jour, que pour son activité antagoniste du VEGF₁₆₅. En effet, la croissance d'une tumeur nécessite que sa vascularisation soit suffisante pour que l'oxygène et les nutriments indispensables à son développement et à sa 10 division rapides lui soient apportés. Une telle vascularisation est assurée par l'angiogénèse qui est, elle-même, augmentée par l'action du VEGF₁₆₅ lié à la neuropiline-1. Le blocage de cette action, au moyen d'un antagoniste du VEGF₁₆₅, comme la sémaphorine-3A qui, en se 15 liant à la neuropiline-1, empêche que le VEGF₁₆₅ le fasse, inhibe l'angiogénèse et de ce fait, diminue la prolifération et la migration des cellules tumorales.

La présente invention se situe donc dans un autre domaine que celui de l'art antérieur, en ce sens qu'elle 20 concerne les cellules épithéliales, et non les cellules endothéliales, et qu'elle repose sur la mise en évidence d'une action directe de la sémaphorine-3A sur l'invasivité des cellules tumorales, action totalement indépendante du VEGF₁₆₅ et inconnue à ce jour.

25 Ainsi, la présente invention concerne une action directe sur l'invasion des cellules tumorales, et non une activité anti-angiogénique. Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, les inventeurs pensent que la sémaphorine-3A interagit avec la neuropiline de manière 30 distincte du VEGF₁₆₅ et entraîne une réponse biologique distincte.

Plus particulièrement, selon un premier aspect, la présente invention concerne un procédé d'évaluation *in vitro* de l'agressivité de cellules tumorales d'un échantillon de 35 tumeur à tester qui consiste à mesurer le niveau d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A dans

des cellules épithéliales saines et dans des cellules tumorales épithéliales dudit échantillon et à déclarer lesdites cellules tumorales comme étant à fort pouvoir invasif si une sous-expression dudit gène y est observée.

5 Par "expression", on entend tout mécanisme conduisant, à travers la transcription de l'ADN en différents ARN et la traduction de l'ARNm en protéines, au décodage de l'information génétique contenue dans le matériel héréditaire. Plus particulièrement, le niveau d'expression 10 d'un gène peut s'effectuer au niveau des ARN ou au niveau des peptides/protéines.

Une "sous-expression" aboutira à une quantité de produits d'expression inférieure à celle obtenue suite à une expression normale et, au contraire, une "sur-expression" 15 aboutira à une quantité supérieure.

Par "tout ou partie" il faut comprendre que le gène peut consister soit en l'ensemble de la séquence nucléotidique codant pour la sémaphorine-3A, soit en une partie seulement de celle-ci, à condition que la séquence 20 conserve la capacité à coder pour ledit gène (homologue fonctionnel). Par "partie de la séquence", il faut comprendre une région de ladite séquence nucléotidique dépourvue d'un ou plusieurs nucléotides terminaux. Il peut également s'agir d'une région de la séquence nucléotidique dans laquelle un ou 25 plusieurs nucléotides ont été déletés ou substitués par d'autres nucléotides.

La présente invention envisage donc de quantifier tous les produits résultant de l'expression du gène codant pour la sémaphorine-3A, par exemple les ARN, mais aussi les ARNm ou 30 encore les peptides/protéines.

Par "fort pouvoir invasif", il faut comprendre une forte probabilité d'une extension extracapsulaire et de formation de métastases.

En pratique, le procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- i) quantification *in vitro* du produit d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A au sein,
- 5 d'une part, desdites cellules tumorales et, d'autre part, desdites cellules saines,
- ii) comparaison des résultats obtenus à l'étape i), et
- 10 iii) déclaration de la tumeur comme étant à fort pouvoir invasif si une sous-expression d'un facteur d'au moins 30, et de préférence d'au moins 10, est observée.

Par "produit d'expression", il faut comprendre tout produit, sous quelque forme que ce soit, résultant du mécanisme d'expression, tel que décrit plus haut.

La quantification *in vitro* du produit d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A peut être effectuée par toute technique connue de l'homme de l'art, comme par exemple un dosage d'expression d'ARNm codant pour la sémaphorine-3A par RT-PCR ou encore un dosage de la sémaphorine-3A par des anticorps spécifiques.

20 Du fait des variations importantes entre individus, les valeurs de référence sont, de préférence, obtenues par dosage dans des cellules de tissu prostatique sain, issues du même patient.

Bien que la présente invention s'applique à tous les 25 types de cancer, elle vise plus particulièrement les cellules prostatiques.

Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne également un procédé d'évaluation *in vitro* de l'efficacité d'un traitement anti-tumoral qui consiste à 30 mesurer, sur un prélèvement de cellules tumorales épithéliales, le niveau d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A à des intervalles de temps prédéterminés et à déclarer ledit traitement comme efficace si l'on observe, au cours des différents intervalles de temps 35 prédéterminés, une augmentation de l'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A.

Ainsi, il est possible de suivre l'évolution d'un traitement donné chez un patient et, le cas échéant, modifier celui-ci si les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants.

Dans une première variante d'exécution de l'invention, 5 ledit produit d'expression consiste en des ARN et/ou ADNc.

Dans ce cas, la présente invention concerne également un kit pour la mise en oeuvre du procédé objet de l'invention qui comprend :

10 a) les amorces s'hybridant spécifiquement avec les ARN et/ou ADNc issus de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A, et

b) les tampons et enzymes nécessaires aux réactions d'amplification, de marquage et d'hybridation.

15 Par "amorces", il faut comprendre toute séquence oligonucléotidique d'ADN s'hybridant spécifiquement à une séquence complémentaire d'ADN simple-brin, lors de l'initiation d'une réPLICATION. Les amorces utilisées dans la présente invention sont décrites plus loin.

20 En pratique, la détermination d'amorces s'effectue couramment, à partir de séquences connues, par mise en oeuvre de programmes informatiques bien connus de l'homme de l'art, tel que le programme Oligo 4 (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN).

25 Dans une seconde variante d'exécution de l'invention, ledit produit d'expression consiste en des protéines.

Dans ce cas, la présente invention concerne également un kit pour la mise en oeuvre du procédé objet de l'invention qui comprend :

30 a) les anticorps se complexant spécifiquement avec les protéines issues de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A,

b) les tampons et enzymes nécessaires aux réactions d'amplification, de marquage et d'hybridation.

35 Selon un troisième aspect, la présente invention envisage l'utilisation de la sémaphorine-3A pour le traitement du cancer de la prostate et, plus

particulièrement, un procédé d'inhibition du pouvoir invasif de cellules tumorales épithéliales qui consiste à augmenter le taux de sémaphorine-3A présent au sein, et/ou à proximité, desdites cellules tumorales épithéliales.

5 Comme décrit plus haut, la nouveauté d'un tel traitement réside, d'une part, dans le fait qu'il cible uniquement l'invasivité des cellules tumorales épithéliales et, d'autre part, dans le fait que la sémaphorine-3A agit directement sur lesdites cellules tumorales épithéliales,
10 c'est-à-dire indépendamment de la "voie VEGF".

Un premier mode de mise en oeuvre du procédé de traitement consiste à augmenter l'expression de tout ou partie du gène endogène codant pour la sémaphorine-3A dans les cellules tumorales épithéliales et/ou à proximité
15 desdites cellules.

Par "gène endogène", il faut comprendre le ou les gène(s) codant pour la sémaphorine-3A présent(s) initialement dans chaque cellule épithéliale.

Un deuxième mode de mise en oeuvre du procédé de
20 traitement selon l'invention consiste à introduire, au sein desdites cellules tumorales épithéliales et/ou à proximité desdites cellules, tout ou partie d'une séquence nucléotidique codant pour la sémaphorine-3A.

L'expression "introduire" ne doit pas être prise au
25 sens littéral, mais envisage toute méthode ayant pour résultat la présence de sémaphorine-3A dans ou à proximité des cellules tumorales épithéliales. Il peut aussi bien s'agir d'une introduction topique que systémique, par voie orale par exemple.

30 Par "gène exogène", il faut comprendre tout gène, ou partie de gène, naturel ou synthétisé, codant pour la sémaphorine-3A qui n'est pas présent initialement dans chaque cellule épithéliale.

Par exemple, un tel gène exogène peut se présenter sous
35 la forme d'un polynucléotide purifié codant pour la

sémathorine-3A, ou encore d'un vecteur recombinant comprenant un polynucléotide codant pour la sémathorine-3A.

Par "polynucléotide purifié", il faut comprendre tout polyribonucléotide ou polydéoxyribonucléotide, c'est-à-dire 5 tout ADN ou ARN modifié ou non, double ou simple brin, qui a été isolé ou séparé de son environnement naturel, et qui est débarrassé des résidus auxquels il est naturellement associé à environ 60%, de préférence environ 75%, et mieux environ 90%.

10 Par "vecteur", il faut comprendre tout système d'expression viral ou non viral connu de l'homme de l'art.

L'expression "recombinant" fait référence aux résultats de méthodes et manipulations dans lesquelles des acides nucléiques, ou tout autre matériel biologique, sont clivés, 15 synthétisés, combinés ou autrement manipulés *in vitro* enzymatiquement, chimiquement ou encore biologiquement pour obtenir les produits désirés dans les cellules ou tout autre système biologique.

Un vecteur recombinant peut être un vecteur de clonage, 20 d'expression ou d'insertion comme un vecteur de type AdV (adénovirus) ou encore AAV (adeno-associated-virus).

Un troisième mode de mise en œuvre du procédé de traitement selon l'invention consiste à introduire, au sein desdites cellules tumorales épithéliales et/ou à proximité 25 desdites cellules, un polypeptide comprenant tout ou partie de la sémathorine-3A en l'état ou partiellement mutée.

Un quatrième mode de mise en œuvre du procédé de traitement selon l'invention repose sur la thérapie cellulaire, c'est-à-dire le recours à toute méthode utilisant 30 des cellules afin de traiter la défaillance d'un tissu ou d'un organe. Plus particulièrement, dans le cas présent, il s'agira d'introduire au sein ou à proximité de l'organe à traiter des cellules capables de sécréter de la sémathorine-3A.

La présente invention envisage donc d'introduire, à proximité des cellules tumorales épithéliales, des cellules capables de sécréter de la sémaphorine-3A.

En pratique, de telles cellules peuvent consister en 5 des cellules de types épithéliale ou fibroblaste capables de sécréter la sémaphorine-3A, de façon naturelle ou après modification desdites cellules, et peuvent être obtenues par toute technique d'ingénierie génétique connue de l'homme de l'art, comme l'intégration d'un vecteur contenant un gène 10 codant pour la sémaphorine-3A dans le génome desdites cellules.

Un cinquième mode de mise en oeuvre du procédé de traitement selon l'invention consiste à introduire, au sein desdites cellules tumorales épithéliales et/ou à proximité 15 desdites cellules tumorales épithéliales, toute substance analogue à la sémaphorine-3A.

Par "substance analogue à la sémaphorine-3A", il faut comprendre toute substance, naturelle ou de synthèse, qui présente les mêmes propriétés que la sémaphorine-3A ou, tout 20 au moins, sa capacité à agir directement sur les cellules tumorales épithéliales indépendamment du VEGF₁₆₅. Pour ce faire, elle doit également présenter la même faculté de liaison à la neuropiline-1.

Dans une forme particulière d'exécution de la présente 25 invention, il est également envisagé un procédé de criblage de substances analogues à la sémaphorine-3A.

Pour ce faire, la présente invention décrit un procédé d'identification de toute substance analogue à la sémaphorine-3A qui consiste à effectuer, sur des cellules 30 tumorales épithéliales, un test d'invasion en l'absence de VEGF₁₆₅, ou en présence de VEGF₁₆₅ mais avec concomitamment présence d'une substance bloquant l'action dudit VEGF₁₆₅, et à retenir comme analogues les substances qui inhibent ladite invasion.

35 Selon un autre aspect encore de la présente invention, il est envisagé une composition pharmaceutique destinée au

traitement des cancers, notamment de la prostate, et, plus particulièrement, à l'inhibition de l'invasivité des cellules tumorales épithéliales.

Plus particulièrement, la présente invention envisage 5 une composition pharmaceutique pour l'inhibition de l'invasivité des cellules tumorales épithéliales qui comprend tout ou partie de la sémaphorine-3A ou du gène codant pour ladite sémaphorine-3A.

Une autre forme de réalisation de la présente invention 10 consiste en une composition pharmaceutique pour l'inhibition de l'invasivité des cellules tumorales épithéliales qui comprend au moins une substance analogue à la sémaphorine-3A.

L'invention sera mieux comprise à la lumière des résultats des expériences suivantes qui se divisent en deux 15 parties, à savoir une première partie touchant l'expression du gène codant pour la sémaphorine-3A et une seconde partie concernant l'action anti-invasivité de la sémaphorine-3A.

MATERIEL ET METHODE

20

I. Mesure d'expression du gène codant pour la sémaphorine-3A

I.1. Patients et échantillons

25 Quarante-quatre tumeurs primaires de la prostate ont été analysées.

Les échantillons de tumeur ont été obtenus auprès de patients subissant une opération chirurgicale à l'hôpital St-Louis à Paris, l'hôpital La Cavale Blanche à Brest et le 30 CHU de Nancy (France). Trente-deux patients avaient une tumeur localisée cliniquement à la prostate, dont dix-sept étaient limitées à la prostate et quinze avaient une extension extra-capsulaire. Douze patients présentaient des carcinomes hormono-réfractaires.

35 Sept échantillons tissulaires de prostate saine ainsi que des ARN issus d'un ensemble de 47 tissus prostatiques

humains sains (commercialisés par Clontech, Palo-Alto, CA) ont été utilisés pour déterminer la quantité de référence d'ARNm codant pour la sémaphorine-3A dans un tissu prostatique sain.

5

I.2. Tissus sélectionnés

Les échantillons de tumeur maligne ainsi que de tumeur bénigne, qui ont été localisées cliniquement, ont été obtenus par prostatectomie radicale, alors que les tumeurs hormono-10 réfractaires ont été obtenues par résection transuréthrale.

Une partie des tissus sélectionnés a été immédiatement placée dans l'azote liquide pour en extraire les acides nucléiques, alors que les sections adjacentes ont été colorées avec H/E (Hematoxyline et Eosine) et ont été 15 examinées histologiquement.

Les zones malignes des échantillons de tumeurs ont été soigneusement sélectionnées par microdissection de manière à obtenir une population cellulaire homogène et ainsi éviter toute "dilution" des modifications génétiques spécifiques aux 20 tumeurs avec les acides nucléiques de cellules normales et réactives présentes dans le même échantillon.

Pour ces raisons, un échantillon est considéré comme convenable pour des études moléculaires si la proportion de cellules tumorales est supérieure à 90% des cellules 25 épithéliales. Le diagnostic histologique, le classement clinique basé sur le système TMM et les scores de Gleason ont été déterminés dans chaque cas au cours d'une manipulation après une opération chirurgicale. Douze étaient des tumeurs hormono-réfractaires alors qu'après un examen pathologique, 30 17 des 32 tumeurs étaient strictement localisées (pT2) et 15 présentaient un dépassement capsulaire (pT3). Les scores de Gleason des carcinomes étaient 4-6 (7 cas), 7 (24 cas) et 8-10 (13 cas).

Les tissus prostatiques sains ont été obtenus par 35 prostatectomie radicale, vérifiés histologiquement et

sélectionnés en fonction de leur normalité et du type de composant cellulaire épithérial.

I.3. Extraction des acides nucléiques

5

a) Extraction des ARN

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'échantillons de tissu en utilisant de l'acide-phénol de guanidium. La qualité des échantillons d'ARN a été contrôlée par 10 électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium. Les bandes d'ARN 18S et 28S ont été visualisées sous lumière ultra-violette afin de vérifier l'évaluation de l'extraction.

15

b) Synthèse des ADNc

Les ARN ont subi une transcription inverse dans un volume final de 20 µl contenant un tampon RT 1X (500 mM de chaque dNTP, 3 mM de MgCl₂, 75 mM de KCl, 50 mM de Tris-HCl à pH 8,3), 10 unités d'inhibiteur de la ribonucléase Rnasin® (Promega, Madison, WI), 10 mM de dithiothréitol, 50 unités de transcriptase reverse Superscript II Rnase H- (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 1,5 mM d'hexamères aléatoires (Pharmacia, Uppsala, Suède) et 1 µg d'ARN totaux. Les échantillons ont été incubés à 20°C pendant 10 minutes et à 42°C pendant 30 25 minutes, et la transcriptase reverse a été inactivée par chauffage à 99°C pendant 5 minutes et refroidissement à 5°C pendant 5 minutes.

I.4. RT-PCR quantitative en temps réel

30

Les valeurs quantitatives ont été obtenues à partir du nombre de cycles seuil (C_t) auquel l'augmentation du signal associée à une croissance exponentielle du produit PCR commence à être détectée (en utilisant un programme d'analyse Biosystems PE), selon le manuel du fabricant.

35

La quantité précise d'ARN totaux ajoutée à chaque réaction (basée sur la densité optique) et sa qualité (c'est-

à-dire l'absence de dégradation extensive) sont toutes deux difficiles à maîtriser. Par conséquent, les transcrits du gène RPLPO (aussi connu comme 36B4) codant pour la phosphoprotéine acide ribosomale humaine (PO) ont été 5 quantifiés comme contrôle d'ARN endogène, et chaque échantillon a été normalisé sur la base de son contenu en RPLPPO. Une tumeur de la prostate (T30) qui contenait le plus petit taux quantifiable avec certitude d'ARNm codant pour la sémaphorine-3A dans les essais a été utilisée comme 10 calibreur.

Les résultats finaux, nommés Nsema3A et exprimés en différence de N-fois entre l'expression relative de la sémaphorine-3A par rapport au gène RPLPO et au calibreur, ont été déterminés comme suit :

15

$$Nsema3A = 2^{(\Delta Ct(\text{échantillon}) - \Delta Ct(\text{calibreur}))}$$

où les valeurs ΔCt de l'échantillon et du calibreur ont été déterminées par soustraction de la valeur moyenne par 20 échantillon (chaque échantillon a été testé deux fois) Ct du gène codant pour la sémaphorine-3A de la valeur moyenne Ct du gène RPLPO. Le rapport a été normalisé de telle sorte que le rapport moyen des 7 échantillons de prostate saine corresponde à une valeur de 1.

25

I.5. Amorces et produits pour la PCR

Les amorces ont été choisies avec l'assistance des programmes informatiques Oligo 4 (National Biosciences, Plymouth, MN) et Primer express (Perckin-Elmer Applied 30 Biosystems, Foster city, CA). Des recherches BLASTN ont été effectuées contre dbEST et nr (le jeu non-redondant de GenBank, bases de données de séquences EMBL et DDBJ) pour confirmer la spécificité totale de gène des séquences nucléotidiques choisies comme amorces. Pour éviter 35 l'amplification d'ADN génomique contaminant, une première

amorce a été placée à la jonction de deux exons et une seconde dans un troisième exon.

Il a été vérifié que, après une réaction PCR, ces amorces donnaient une bande unique sur gel d'agarose ; les 5 produits de PCR ont de plus été purifiés et séquencés pour confirmer la spécificité des amorces.

Les séquence nucléotidiques des amorce sont les suivantes :

10 Sémaphorine-3A

Upper primer 5'-CCTATGAACAATGCCCAATAGTG-3'

Lower primer 5'-CTTAAGAACGGTCCCAACATCTGT-3'

RPLPO

Upper primer 5'-GGCGACCTGGAAAGTCCAAT-3'

Lower primer 5'-CCATCAGCACACAGCCTTC-3'

15

I.6. amplification PCR

Toutes les réactions PCR ont été effectuées en utilisant un système de détection de séquence Prism ABI 7000 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). La PCR a été effectuée en 20 utilisant le kit de réactifs SYBR® Green PCR Core (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Les conditions au cours des cycles thermiques comprennent une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes et 45 cycles comprenant 15 secondes à 95°C suivi de 1 minute à 65°C. Les expériences ont été 25 effectuées en double pour chaque point de données.

II. Essais d'invasivité

II.1. Clonage de la sémaphorine-3A.

30 L'ADNc de la sémaphorine-3A, d'une taille de 2,3 kb, a été obtenu par RT-PCR à partir de la lignée prostatique CaHPV10. Cet ADNc a tout d'abord été cloné entre les sites de restriction EcoRI et XbaI du vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo (+) (Invitrogen). Il a ensuite été modifié par

PCR, afin de supprimer le codon de terminaison de la traduction, et a finalement été cloné, en phase avec les épitopes myc et histidine, entre les sites de restriction EcoRI et XbaI du vecteur pcDNA4/Myc-His (Invitrogen).

5 L'intégrité de l'ADNc, cloné dans le vecteur pcDNA4/Myc-His, a été vérifiée par séquençage direct. Sa séquence est identique à celle publiée par Kolodkin et al. (n° accession L26081).

Les séquences des amorces utilisées pour 10 l'amplification sont les suivantes :

Amorce 5' : 5' CGG AAT TCT GCA GCA TGG GCT GGT TAA CT 3'

Amorce 3' : 5' GCT CTA GAT CAG ACA CTC CTG GGT GCC CT 3'

15 Les séquences des amorces utilisées pour supprimer le codon stop sont les suivantes :

Amorce 5' : 5' GGA ACA TGG GTT CAT ACA AAC TCT TCT TA 3'

Amorce 3' : 5' GC TCT AGA GAC ACT CCT GGG TGC C 3' . . .

20

II.2. Préparation de milieu conditionné.

Les cellules Cos-7 (ECACC) sont ensemencées à raison de 20 000 cellules/cm² dans du RPMI 10% FCS, 24 heures avant la transfection dans un flacon de 75 cm³ (T75). Les cellules 25 sont transfectées soit par le vecteur pcDNA4/Myc-HIS soit par ce vecteur contenant l'ADNc de la sémaphorine-3A. Le mélange suivant est ajouté pour un flacon T75 : 15 µg d'ADN dans 1,5 ml de RPMI sans sérum contenant 45 µl de FuGENE 6 (Roche). Les cellules sont incubées 72 heures à 37°C dans une 30 étuve à CO₂. Le surnageant est récolté puis centrifugé 2 fois pour éliminer les débris cellulaires.

II.3. Contrôle de la présence de sémaphorine-3A dans le milieu conditionné par immunoprecipitation et Western-blot.

35 Un ml de milieu conditionné, récolté 72 heures après la transfection des cellules, est incubé avec 2 µg d'anticorps

monoclonal anti-myc (Santa Cruz mouse monoclonal anti-c-Myc sc-40) à 4°C, pendant 16 heures sur agitateur rotatif. Le complexe formé par l'anticorps est précipité par 20 µl de billes de sépharose G (Amersham Pharmacia Biotech) diluées au 5 demi dans du PBS. Le mélange est incubé 30 minutes à 4°C sur agitateur rotatif. Après centrifugation, le culot contenant le complexe Sema3A/Myc-anticorps-billes est repris dans 20 µl de tampon Laemmli Sample Buffer (Biorad) et chargé sur gel SDS-PAGE 7%. En parallèle, les cellules Cos-7 transfectées 10 par pcDNA4/Myc-HIS vide ou contenant la sémaphorine-3A sont lysées dans le tampon contenant 50 mM de Tris pH 8, 200 mM de NaCl, 1% NP40, 0,5% d'acide déoxycholique, 0,05% SDS, 2 mM d'EDTA.

Par "vide", il faut comprendre "ne comprenant pas de 15 sémaphorine-3A".

Cinquante microgrammes de protéines venant de l'extrait total sont chargées sur gel SDS-PAGE 7%. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée 1 heure à température ambiante dans du 20 PBS contenant 5% de lait écrémé (Biorad) pour bloquer les sites non spécifiques. La membrane est ensuite incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire anti myc (mouse monoclonal anti c-Myc sc-40, Santa Cruz) dilué à 2 ng/ml dans du PBS contenant 5% de lait écrémé. La membrane 25 est rincée 4 fois, à chaque fois pendant 10 minutes, dans du PBS contenant 0,1% tween 20 avant d'être incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Rabbit anti mouse HRP, Dako). Le rinçage est identique à celui décrit précédemment puis la membrane est incubée 5 minutes dans le 30 réactif ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech). La détection de la fluorescence est effectuée grâce à un détecteur Storm.

Les résultats sont regroupés dans la figure 1, dans laquelle :

colonne 1 : immunoprecipitation et Western-blot avec 35 anticorps anti-myc sur 1 ml de milieu de cellules Cos-7 transfectées avec pcDNA4.1 vide,

colonne 2 : immunoprecipitation et Western-blot avec anticorps anti-myc sur 1 ml de milieu de cellules Cos-7 transfectées avec pcDNA4.1 contenant l'ADNc de la sémaphorine-3A, et

5 colonne 3 : Western blot réalisé sur 50 µg d'extrait total de cellules Cos-7.

II.4. Essais d'invasion.

Les cellules PC3 sont déposées à raison de 40 000 10 cellules par puits dans des chambres d'invasion (BioCoat Matrigel Invasion Chamber, Becton Dickinson, Bedford, MA) dans du milieu conditionné (pcDNA4/Myc-HIS vide ou contenant la sémaphorine-3A). Le milieu conditionné est également déposé dans le compartiment inférieur de la chambre. Pour les 15 essais réalisés en présence d'anticorps anti-VEGF₁₆₅ (AF-293-NA, R&D system), cet anticorps est ajouté à la concentration de 0,5 µg/ml dans le milieu conditionné. Les cellules sont incubées 48 heures à 37°C dans un incubateur à CO₂ puis les cellules non invasives sont éliminées du compartiment 20 supérieur de la chambre d'invasion. Les cellules invasives ont digéré le matrigel, traversé les pores de 8 µm de la membrane et adhèrent sur la face inférieure de la membrane. Afin de quantifier les cellules invasives, celles-ci sont colorées avec une solution contenant 0,5% de crystal violet 25 dans 25% de méthanol. La membrane est alors découpée et montée entre lame et lamelle. Les cellules sont ensuite quantifiées par observation sous microscope.

Les résultats sont regroupés dans la figure 2, dans laquelle :

30 colonne 1 : milieu conditionné provenant de cellules Cos-7 transfectées par pcDNA4.1 vide et en absence de VEGF₁₆₅, colonne 2 : milieu conditionné provenant de cellules Cos-7 transfectées par pcDNA4 contenant l'ADNc de la sémaphorine-3A et en absence de VEGF₁₆₅,

colonne 3 : milieu conditionné provenant de cellules Cos-7 transfecté par pcDAN4.1 vide et en présence de l'anticorps anti-VEGF₁₆₅,

colonne 4 : milieu conditionné provenant de cellules 5 Cos-7, transfectées par pcDNA4 contenant l'ADNC de la sémaphorine-3A en présence de l'anticorps anti-VEGF₁₆₅, et

RESULTATS

10 I. Mesure d'expression du gène codant pour la sémaphorine-3A

Les niveaux d'expression relative de la sémaphorine-3A ont été quantifiés dans 44 tumeurs malignes, 7 correspondant 15 à des tissus de prostate saine, et les ARN d'un ensemble de 47 tissus de prostate humaine saine (Clontech). Les niveaux d'expression sont déterminés sous la forme de rapports entre la sémaphorine-3A et le gène RPLPO de référence afin de corriger les variations dans la quantité d'ARN.

20 Pour un échantillon individuel, une sous-expression est considérée comme significative si le niveau d'expression est inférieur à la valeur moyenne de l'expression de sémaphorine-3A dans les échantillons normaux moins 3 fois la déviation standard.

25 Vingt-quatre des 32 échantillons de tumeurs cliniquement localisées et 6 des 12 échantillons de tumeurs hormono-réfractaires montrent une sous-expression de la sémaphorine-3A.

Dans l'ensemble, les résultats montrent une diminution 30 significative de l'expression de la sémaphorine-3A dans les échantillons de tumeurs prostatiques par rapport aux échantillons de prostate saine ($p<0,001$). La sémaphorine-3A apparaît ainsi sous-exprimée d'un facteur 10 environ dans les échantillons tumoraux par rapport au tissu normal.

II. Essais d'invasivité

L'ADNc de la sémaphorine-3A a été cloné en phase avec les épitopes myc et histidine du vecteur pcDNA4/Myc-HIS. La 5 protéine produite contient donc les épitopes myc et his. Il a été préparé un milieu de culture cellulaire contenant la forme soluble de la sémaphorine-3A en transfectant des cellules Cos-7. Soixante-douze heures après transfection, le milieu est récolté et utilisé pour les expériences 10 d'invasion. La présence de sémaphorine-3A a été détectée, par immunoprecipitation et Western-blotting, dans le surnageant et les extraits cellulaires des cellules Cos-7 transfectées (Figure 1, colonnes 2 et 3). En contrôle, il a été montré que le surnageant des cellules Cos-7 transfectées par le vecteur 15 pcDNA4/Myc-HIS ne contient pas de sémaphorine-3A (Figure 1, colonne 1).

Les expériences d'invasion ont été réalisées avec des cellules prostatiques tumorales PC3 et ont montré que ces cellules surexpriment la neuropiline et expriment de très 20 faibles quantités de sémaphorine-3A qui est un de ses ligands. On a cherché à déterminer si la restauration d'une expression de la sémaphorine-3A pouvait jouer un rôle dans l'inhibition des propriétés tumorales des cellules PC3. A cette fin, les expériences d'invasion ont été réalisées dans 25 des chambres contenant du matrigel déposé sur une membrane qui possède des pores de 8 µm. Les cellules ont été déposées dans le compartiment supérieur de la chambre dans du milieu de culture, le compartiment inférieur contenant également du milieu. Des cellules invasives digèrent le matrigel et 30 migrent à travers les pores dans le compartiment inférieur. Les expériences ont été réalisées en présence de milieu conditionné préparé, d'une part, à partir de surnageant de cellules Cos-7 transfectées par le vecteur pcDNA4/Myc-HIS (milieu contrôle) et, d'autre part, à partir du surnageant de 35 cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur pcDNA4/Myc-HIS contenant l'ADNc de la sémaphorine-3A. Deux expériences

indépendantes ont été réalisées en triple pour chaque condition. Les cellules invasives ont été quantifiées sous la membrane en microscopie et, pour chaque chambre d'invasion, deux champs différents ont été quantifiés. Les résultats sont 5 présentés sous forme de pourcentages par rapport au nombre de cellules invasives dans le milieu vide ou de contrôle : on constate que la présence de sémaphorine-3A dans le milieu inhibe la capacité invasive des cellules PC3 de 60 à 70% (Figure 2, colonnes 1 et 2). Les inventeurs ont montré que 10 les cellules PC3 sécrètent de faibles quantités de VEGF₁₆₅. Afin de confirmer le rôle de la sémaphorine-3A indépendamment de la voie VEGF₁₆₅, des expériences d'invasion en présence d'un anticorps bloquant l'action du VEGF₁₆₅ sécrété par les cellules PC3 ont été réalisées. L'anticorps ajouté à la 15 concentration de 0,5 µg/ml dans le milieu conditionné ne modifie pas l'invasion des cellules PC3 que ce soit en l'absence (Figure 2, colonne 3) ou en présence de la sémaphorine-3A dans le milieu conditionné (Figure 2, colonne 4). Le rôle inhibiteur de la sémaphorine-3A sur la capacité 20 invasive des cellules PC3 est donc ainsi montré. Il a également été démontré que le VEGF₁₆₅ sécrété par les cellules PC3 n'a pas d'effet sur l'invasivité des cellules, puisque le blocage du VEGF₁₆₅ par un anticorps spécifique ne modifie pas l'invasivité des cellules. En conséquence, la sémaphorine-3A 25 a bien un rôle direct et agoniste qui inhibe fortement le pouvoir invasif des cellules tumorales épithéliales.

REFERENCES

1. Cuzin B. & Thoral JE., "Opportunité d'un dépistage systématique du cancer de la prostate par le dosage de l'antigène spécifique de la prostate", Document de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), 121 pages (1998)
2. Grosclaude P., Menegoz F., Schaffer P., Macé Lesec'h J., Avreux P., Lemab G. & al, "Dépistage du cancer de la prostate (II). Le cancer de la prostate est-il un problème de santé publique ? Actualisation des chiffres d'incidence et de mortalité en France de 1982 à 1990", Progrès Urol., 7/647-54 (1997)
3. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer & International Association of Cancer Registries, "Age-standardized and cumulative incidence : rates and standard errors. Prostate (ICD-9 185)", IARC, pp 970-1 (1992)
4. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z., "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors", FASEB J. 1999 Jan;13(1):9-22.
5. Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM., "Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors", Cell. 1999 Oct 1;99(1):59-69.
6. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM., "Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates", Cell. 1999 Oct 1;99(1):71-80.

7. Liu BP, Strittmatter SM., "Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins", *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Oct;13(5):619-26.

5

8. Pasterkamp RJ, Verhaagen J., "Emerging roles for semaphorins in neural regeneration", *Brain Res Brain Res Rev.* 2001 Mar;35(1):36-54.

10 9. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M., "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor", *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):735-45.

15 10. Fuh G, Garcia KC, de Vos AM., "The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1", *J Biol Chem.* 2000 Sep 1;275(35):26690-5.

11. Ortega N, Hutchings H, Plouet J., "Signal relays in 20 the VEGF system", *Front Biosci.* 1999 Feb 1;4:D141-52.

12. Soker S., "Neuropilin in the midst of cell migration and retraction", *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Apr;33(4):433-7.

25

13. Rossignol M, Gagnon ML, Klagsbrun M., "Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms", *Genomics.* 2000 Dec 1;70(2):211-22.

30

14. Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S, Klagsbrun M., "Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity.", 35 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2573-8.

15. Miao HQ, Soker S, Feiner L, Alonso JL, Raper JA, Klagsbrun M., "Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165", *J Cell Biol.* 1999 Jul 12;146(1):233-42.
16. Shima DT, Mailhos C., "Vascular developmental biology: getting nervous.", *Curr Opin Genet Dev.* 2000 Oct;10(5):536-42.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'évaluation *in vitro* de l'agressivité de cellules tumorales d'un échantillon de tumeur à tester, 5 caractérisé en ce qu'il consiste à mesurer le niveau d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A dans des cellules épithéliales saines et dans des cellules tumorales épithéliales dudit échantillon et à déclarer lesdites cellules tumorales comme étant à 10 fort pouvoir invasif si une sous-expression dudit gène y est observée.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 i) quantification *in vitro* du produit d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A au sein, d'une part, desdites cellules tumorales et, d'autre part, desdites cellules saines,

ii) comparaison des résultats obtenus à l'étape i), et

20 iii) déclaration de la tumeur comme étant à fort pouvoir invasif si une sous-expression d'un facteur d'au moins 3 est observée.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite tumeur est déclarée à fort pouvoir invasif si 25 une sous-expression d'un facteur d'au moins 10 est observée.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales consistent en des cellules prostatiques.

30 5. Procédé d'évaluation *in vitro* de l'efficacité d'un traitement anti-tumoral, caractérisé en ce qu'il consiste à mesurer, sur un prélèvement de cellules tumorales épithéliales, le niveau d'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A à des intervalles de 35 temps prédéterminés et à déclarer ledit traitement comme efficace si l'on observe, au cours des différents intervalles de temps prédéterminés, une augmentation de

l'expression de tout ou partie du gène codant pour la sémaphorine-3A:

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que ledit produit d'expression 5 consiste en des ARN et/ou ADNc.

7. Kit pour la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) les amorces s'hybridant spécifiquement avec les ARN et/ou ADNc issus de tout ou partie du gène codant pour 10 la sémaphorine-3A, et

b) les tampons et enzymes nécessaires aux réactions d'amplification, de marquage et d'hybridation.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que ledit produit d'expression 15 consiste en des protéines..

9. Kit pour la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) les anticorps se complexant spécifiquement avec les protéines issues de tout ou partie du gène codant pour 20 la sémaphorine-3A,

b) les tampons et enzymes nécessaires aux réactions d'amplification, de marquage et d'hybridation.

10. Procédé d'inhibition du pouvoir invasif de cellules tumorales épithéliales, caractérisé en ce qu'il 25 consiste à augmenter le taux de sémaphorine-3A présent au sein, et/ou à proximité, desdites cellules tumorales épithéliales.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il consiste à augmenter l'expression de tout ou 30 partie du gène endogène codant pour la sémaphorine-3A dans les cellules tumorales épithéliales et/ou à proximité desdites cellules.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire, au sein desdites cellules 35 tumorales épithéliales et/ou à proximité desdites cellules, tout ou partie d'une séquence nucléotidique codant pour la sémaphorine-3A.

13. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire, au sein desdites cellules tumorales épithéliales et/ou à proximité desdites cellules, un polypeptide comprenant tout ou partie de la sémaphorine-3A en l'état ou partiellement mutée.

14. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire, à proximité des cellules tumorales épithéliales, des cellules capables de sécréter de la sémaphorine-3A.

15. Procédé d'inhibition du pouvoir invasif de cellules tumorales épithéliales, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire, au sein desdites cellules tumorales épithéliales et/ou à proximité desdites cellules tumorales épithéliales, toute substance analogue à la sémaphorine-3A.

16. Procédé d'identification de toute substance analogue à la sémaphorine-3A, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer, sur des cellules tumorales épithéliales, un test d'invasion en l'absence de VEGF₁₆₅, ou en présence de VEGF₁₆₅ mais avec concomitamment présence d'une substance bloquant l'action dudit VEGF₁₆₅, et à retenir comme analogues les substances qui inhibent ladite invasion.

17. Composition pharmaceutique pour l'inhibition de l'invasivité des cellules tumorales épithéliales, caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la sémaphorine-3A ou du gène codant pour ladite sémaphorine-3A.

18. Composition pharmaceutique pour l'inhibition de l'invasivité des cellules tumorales épithéliales, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une substance analogue à la sémaphorine-3A.

1 / 2

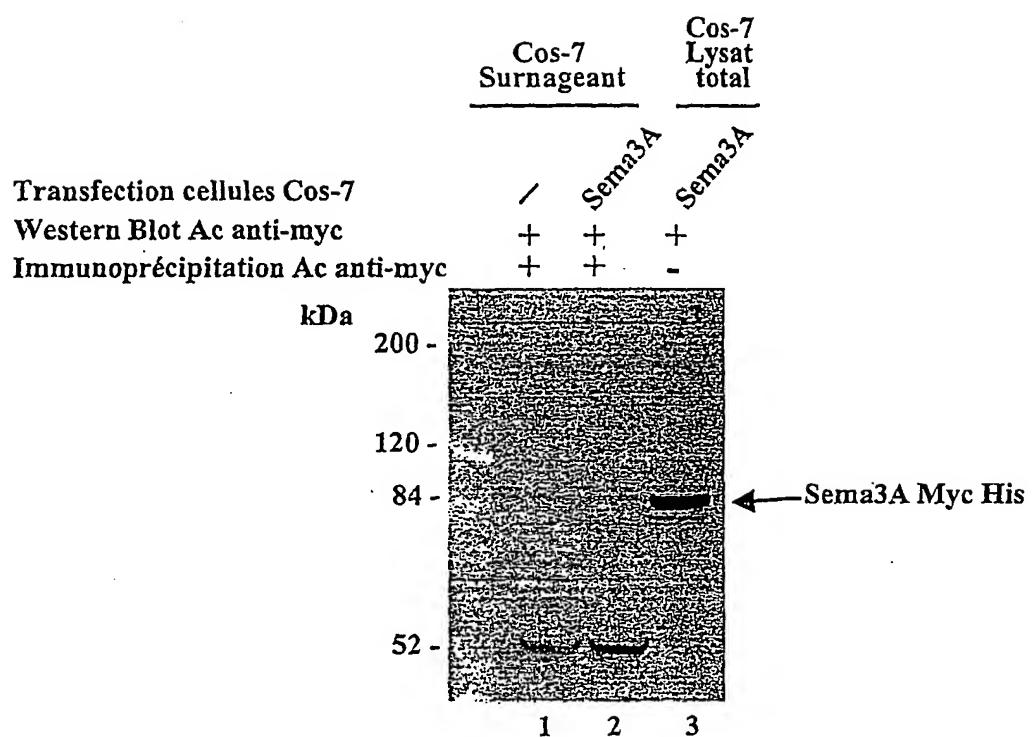


FIGURE 1

2/2

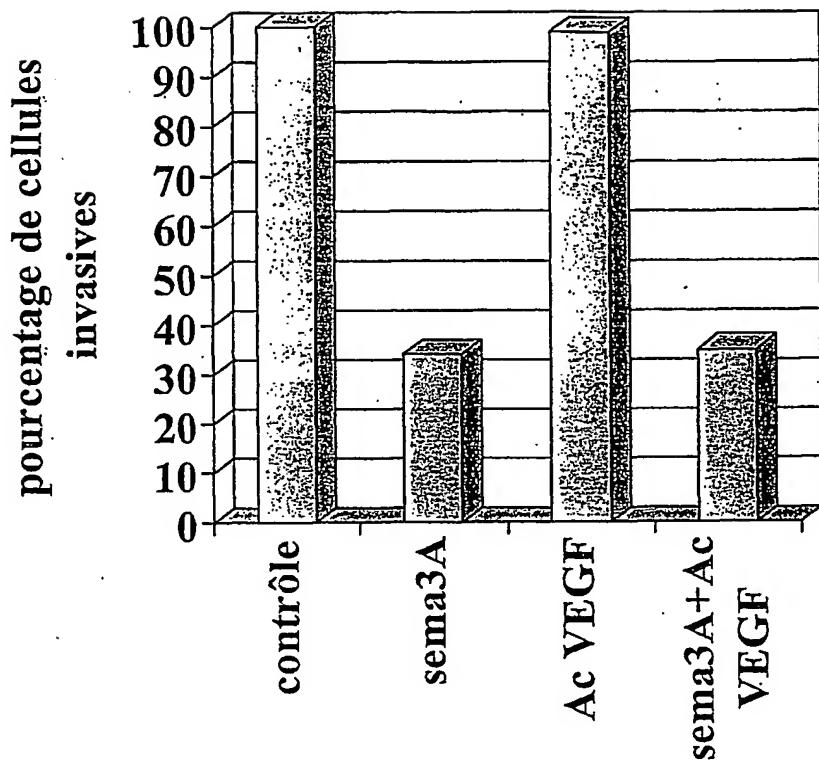


FIGURE 2